

# 烙铁头蛇毒血小板聚集素对大鼠 血小板聚集作用及药物影响

徐理纳 王建平 刘秦越

(中国医学科学院药物研究所 北京)

## 摘 要

采用比浊法观察烙铁头 *Trimeresurus mucrosquamatus* 蛇毒血小板聚集素 (TMVA) 诱导大鼠血小板聚集。TMVA在 $0.5\mu\text{g/ml}$ 即可引起血小板聚集,  $20-50\mu\text{g/ml}$ 聚集率可高达80%左右, 均为不可逆聚集。对低浓度 ( $5\mu\text{g/ml}$ ) TMVA诱导的血小板聚集, 阿魏酸钠和前列腺素 $E_1$ 没有明显影响, 前列环素 ( $\text{PGI}_2$ ) 可增强其聚集活性; 对高浓度 ( $20\mu\text{g/ml}$ ) TMVA诱导的聚集, 阿魏酸钠和前列腺素 $E_1$ 可拮抗其聚集作用,  $\text{PGI}_2$ 有抑制聚集趋势。静注阿魏酸钠 ( $236\text{mg/kg}$ ) 不影响以TMVA和ADP诱导的血小板聚集, 对胶原诱导的聚集有显著抑制作用。川芎嗪 ( $1-4\text{mM}$ ) 对TMVA诱导的聚集无明显影响。

**关键词** 烙铁头蛇毒 血小板聚集 大鼠 阿魏酸钠 前列腺素 $E_1$

烙铁头蛇毒血小板聚集素可诱导人和多种动物(狗、家兔、豚鼠)血小板聚集, 并通过血小板花生四烯酸(AA)代谢途径生成血栓素 $A_2(\text{TXA}_2)$ , 但其活化血小板机理可能通过不依赖血小板AA代谢途径(阮长耿等, 1983)。前列环素 ( $\text{PGI}_2$ ) 和前列腺素 $E_1$  ( $\text{PGE}_1$ ) 对多种诱导剂所引起的血小板聚集均有阻抑作用(Weise, 1983)。阿魏酸钠和川芎嗪可抑制血小板 $\text{TXA}_2$ 的生成(徐理纳等, 1984; 蔺桂芳等, 1980)。我们观察了TMVA对大鼠血小板的聚集作用及上述几种药物对TMVA诱导的大鼠血小板聚集性的影响。

## 材 料 和 方 法

(一) 材料 实验用150克以上的雄性大鼠。TMVA系中国科学院昆明动物研究所提供, 为TMVA Tris缓冲液经真空干燥的粉末, 临用时以蒸馏水溶解和稀释。可溶

韩一虹同志参加部分预试实验, 特此致谢。

性胶原为Hormone厂产品, ADP钠盐购自Sigma厂,  $\text{PGI}_2$  钠盐为美国Wellcome厂赠送,  $\text{PGE}_1$  为白求恩医科大学生产, 纯度88%。阿魏酸钠由本所植化室提供, 盐酸川芎嗪为北京制药厂产品。

(二) 方法 将大鼠以戊巴比妥钠麻醉, 用硅化注射器从腹主动脉取血。血液以0.11M枸橼酸钠按9:1(V/V)抗凝, 离心10分钟(1000转/分), 取出的上层液即为富含血小板血浆 (PRP)。其余血浆继续离心10分钟(3000转/分), 分离出的上清液即为贫血小板血浆 (PPP)。一般实验中PRP的血小板数调节在45—50万/ $\text{mm}^3$ 。

按Born氏比浊法测定血小板聚集性。采用日本PAT—4A型NIKO四导血小板聚集仪进行实验。每次取PRP 0.2ml置于比浊管中, 加药液 (一般为10 $\mu\text{l}$ ) 后于37°C温孵2分钟, 然后加诱导剂 (10 $\mu\text{l}$ ), 记录加诱导剂后5分钟的聚集曲线, 并计算最大聚集率 (%)。

## 结 果

### (一) TMVA诱导血小板聚集作用

将2—4只大鼠PRP混合, 每次取0.2ml PRP, 加不同浓度的TMVA, 不同终浓度TMVA (0.125—50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的血小板聚集率见表1。由表1可见, TMVA在0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即可引起血小板聚集 (14%), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时血小板聚集率为60%, 20—50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 聚集率高达80%左右, 均为不可逆聚集。

表1 不同浓度TMVA对大鼠血小板聚集性的影响 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ,  $n = 5$ )

Table. 1 Effect of TMVA on rat platelet aggregation ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ,  $n = 5$ )

TMVA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	% Aggregation	TMVA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	% Aggregation
0.125	3 $\pm$ 1	5	35 $\pm$ 7
0.25	6 $\pm$ 3	10	60 $\pm$ 21
0.5	14 $\pm$ 4	20	79 $\pm$ 5
1.0	21 $\pm$ 6	25	79 $\pm$ 4
2.5	28 $\pm$ 6	50	80 $\pm$ 4

### (二) 阿魏酸钠和盐酸川芎嗪对TMVA诱导血小板聚集的影响

1. 体外给药 采用低浓度 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 和高浓度 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) TMVA诱导血小板聚集, 观察阿魏酸钠和川芎嗪的作用, 对照管加10 $\mu\text{l}$ 生理盐水或5 $\mu\text{l}$  pH 3—4蒸馏水 (川芎嗪对照液)。为与TMVA作对比研究, 同时也观察两药对胶原诱导血小板聚集的影响。

实验结果如表2所示, 阿魏酸钠对低浓度TMVA诱导聚集作用无影响, 可是, 阿魏酸钠 (4 mM) 对高浓度TMVA诱导的聚集反而有显著抑制作用。与上述结果不同, 阿魏酸钠对胶原诱导聚集的阻抑作用较为明显, 并且, 对低浓度胶原作用的抑制强于对高浓度胶原作用的抑制。川芎嗪不影响TMVA诱导的聚集, 4 mM可抑制胶原诱导的聚集反应。

表 2 阿魏酸钠和盐酸川芎嗪体外给药对 TMVA 诱导大鼠血小板聚集性的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 3$ )

Table. 2 Effects of Sodium Ferulate and tetramethylpyrazine on rat platelet aggregation induced by TMVA

Inducer	Sodium Ferulate			Tetramethylpyrazine		
	Concentration (mM)	Aggregation (%)	value	Concentration (mM)	Aggregation (%)	value
TMVA	Control	35 ± 9		Control	39 ± 3	
	5 µg/ml	33 ± 4	>0.05	1	37 ± 3	>0.05
	4	33 ± 3		4	39 ± 3	>0.05
	Control	65 ± 7		Control	85 ± 10	
	20 µg/ml	79 ± 6	>0.05	1	81 ± 8	>0.05
	4	52 ± 21	<0.05	4	76 ± 4	>0.05
collagen	Control	78 ± 6		Control	71 ± 9	
	20 µg/ml	49 ± 8	<0.01	1	65 ± 11	>0.05
	4	0	<0.01	4	15 ± 26	<0.05
	Control	76 ± 4				
	50 µg/ml	49 ± 24	>0.05			
	4	24 ± 13	<0.05			

表 3 阿魏酸钠 (236mg/kg iv) 对 TMVA 诱导的大鼠的血小板聚集的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 5 - 6$ )

Table. 3 Effects of sodium Ferulate (S. F.) in vivo (236 mg/kg iv) on rat platelet aggregation induced by TMVA ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 5 - 6$ )

Inducer final	Drug	Aggregation %	inhibition %	P value
Concentration TMVA (5 µg/ml)	Control	34 ± 5		
	S. F.	37 ± 10	-10%	>0.05
Collagen (50~75 µg/ml)	Control	67 ± 10		
	S. F.	35 ± 20	47%	<0.01
ADP (5 µg/ml)	Control	77 ± 13		
	S. F.	70 ± 12	9%	>0.05

2. 体内给药 给大鼠静脉注射阿魏酸钠 236mg/kg 后即刻从腹主动脉取血, 制备富含血小板血浆。观察胶原和ADP、TMVA诱导血小板聚集性变化。阿魏酸钠对低浓度TMVA和ADP诱导的聚集没有影响, 对胶原诱导聚集有明显抑制作用(表3)。

### (三) $\text{PGE}_1$ 和 $\text{PGI}_2$ 对TMVA诱导的血小板聚集性的影响

$\text{PGE}_1$  对TMVA诱导聚集的影响与阿魏酸钠相似, 即对低浓度TMVA诱导聚集无明显影响, 但可抑制高浓度TMVA诱导的聚集。

表4  $\text{PGE}_1$  对TMVA诱导的大鼠血小板聚集性的影响 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ,  $n = 3$ )

Table. 4 Effects of  $\text{PGE}_1$  on rat platelet aggregation induced by TMVA

Inducer		$\text{PGE}_1$	
		Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Aggregation (%)
TMVA	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	41 $\pm$ 2
		0.05	39 $\pm$ 1
		0.5	45 $\pm$ 5
	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	85 $\pm$ 2
		0.5	38 $\pm$ 3
			<0.01
Collagen	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	55 $\pm$ 18
		0.05	0
		0.5	0
			<0.01

$\text{PGI}_2$  10ng/ml和25ng/ml对ADP (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 和胶原 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 均有显著抑制作用, 对低浓度TMVA有促进聚集作用,  $\text{PGI}_2$  25ng/ml可使TMVA (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 诱导的血小板聚集率增加45%, 对高浓度TMVA诱导聚集有抑制趋势。

## 讨 论

TMVA可诱导血小板聚集, 同时伴有血小板 $\text{TXA}_2$ 的生成。阿司匹林可阻断TMVA诱导家兔血小板 $\text{TXA}_2$ 样物质的形成, 但并不影响TMVA的血小板聚集作用, 提示TMVA可能通过不依赖于 $\text{TXA}_2$ 或AA代谢途径而诱导血小板聚集(阮长耿, 1983)。

据研究(徐理纳等, 1984), 阿魏酸钠在终浓度0.25—1.0mg/ml (相当于1.2—4.6mM) 时对胶原诱导的血小板 $\text{TXA}_2$ 样物质的活性有明显抑制作用。本文中阿魏酸钠4mM可抑制高浓度(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) TMVA诱导的大鼠血小板聚集。从而推测, TMVA (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 诱导的大鼠血小板聚集可能通过血小板AA代谢。

阿魏酸钠、川芎嗪、 $\text{PGE}_1$  和  $\text{PGI}_2$  对低浓度 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) TMVA诱导的血小板聚集都无抑制作用, 此浓度TMVA可能系通过不依赖于AA代谢途径而活化血小板。

表 5 PGI<sub>2</sub>对TMVA 诱导的大鼠血小板聚集的影响( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 3$ )Table. 5 Effects of PGI<sub>2</sub> on rat platelet aggregation induced by TMVA

Inducer	PGI <sub>2</sub>			Inducer	PGI <sub>2</sub>			Inducer	PGI <sub>2</sub>			
	Concentration ng/ml	Aggrega- tion %	P value		Concentration ng/ml	Aggrega- tion %	P value		Concentration ng/ml	Aggrega- tion %	P value	
5 µg/ml	Control	31 ± 3		Collagen	Control	58 ± 8		ADP	Control	62 ± 2		
	10	36 ± 2	>0.05		10	0	<0.01		10	46 ± 5	<0.01	
	25	45 ± 8	<0.05		25	0	<0.01		25	22 ± 2	<0.01	
	Control	78 ± 5			Control	68 ± 0						
	10	71 ± 6	>0.05		50µg/ml	10	61 ± 1		<0.05			
	25	58 ± 25	>0.05		25	1 ± 1	<0.01					
20µg/ml	Control				Control				Control			
	10				10				10			
	25				25				25			

PGE<sub>1</sub>和PGI<sub>2</sub>通过激活腺苷酸环化酶,升高血小板c-AMP水平而抑制血小板聚集(Weiss, 1983)。血小板c-AMP水平升高可抑制血小板聚集,一方面通过对磷脂酶和环氧酶的抑制而阻断TXA<sub>2</sub>的生成,另一方面可激活蛋白激酶,使蛋白磷酸化,促进血小板微密管道系统对胞浆内Ca<sup>++</sup>的再摄取(LassLo & Quintana 1984)。PGE<sub>1</sub>和PGI<sub>2</sub>对高浓度(20μg/ml) TMVA诱导的血小板聚集有抑制作用或抑制趋势,可能与其激活腺苷酸环化酶,增加血小板内c-AMP含量有关。至于PGI<sub>2</sub>对低浓度(5μg/ml) TMVA诱导聚集不仅没有抑制作用,反而增加其聚集活性,目前尚不能解释。

川芎嗪1.5—6 mM对TMVA(10μg/ml)诱导的人血小板聚集和5-HT释放有明显抑制作用(阮长耿, 1986),本文结果川芎嗪1—4 mM不抑制TMVA(5—20μg/ml)诱导的大鼠血小板聚集。上述的不同结果可能是由于种属不同等原因所致。

本文研究结果也说明,与胶原和ADP比较, TMVA诱导的血小板聚集不易为血小板抑制剂所阻抑。若能阐明TMVA活化血小板的机理,则TMVA可作为一个新诱导剂应用于抗血小板药的机理研究。

### 参 考 文 献

- 王婉瑜等 1983 烙铁头蛇毒的研究(I) 柱层析分离及酶活性与生物活性测定。动物学研究 4(4):327
- 阮长耿等 1983 烙铁头蛇毒对血小板的活化作用。动物学研究 4(3):245
- 徐理纳等 1984 阿魏酸钠抗血小板作用机理研究——对TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>平衡的影响。中国医学科学院学报 6:414
- 黄桂芬等 1980 血小板TXA<sub>2</sub>的药理学调节I, 川芎嗪对血小板TXA<sub>2</sub>的生物合成及其生物活性的影响。北京第二医学院学报 (1):5
- Lasslo A, Quintana RP 1984 Interaction dynamics of blood platelets with medicinal agents and other chemical entities. In: Lasslo A (ed.) Blood platelet function and medicinal chemistry. Elsevier, Amsterdam pp. 229—314
- Weiss HJ 1983 Antiplatelet drugs, pharmacologic aspects. In Weiss HJ (ed.) Platelets, pathophysiology and antiplatelet drug therapy. Alan R Liss Inc. New York pp. 45—107

## THE EFFECTS OF SODIUM FERULATE, TETRAMETHYLPYRAZINE, PROSTAGLANDIN E<sub>1</sub> AND PROSTACYCLIN ON PLATELET AGGREGATION INDUCED BY THE VENOM OF *TRIMERESURUS* *MUCROSQUAMATUS* IN RATS

Xu Lina Wang Jianping Liu Qinyue

(Department of Pharmacology, Institute of Materia  
Medica, Chinese Academy of Medical Sciences)

The platelet aggregation induced by the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (TMVA) was estimated by turbidimetric method in rats. TMVA at the concentration of 0.5ug/ml elicited platelet aggregation. The ratio of aggregation may be 80% more or less when TMVA was used at the concentration of 20—50 ug/ml. All the aggregations induced by TMVA were irreversible.

Sodium ferulate and PGE<sub>1</sub> showed no significant effect on the aggregation induced by the lower concentration (5 ug/ml) of TMVA, while prostacyclin seemed to potentiate the aggregation. Both sodium ferulate and PGE<sub>1</sub> inhibited the aggregation induced by the higher concentration (20ug/ml) of TMVA, while prostacyclin showed a tendency to inhibit the aggregation. Tetramethylpyrazine (1—4 mM) showed no significant effect on the platelet aggregation induced by TMVA. After the intravenous injection of sodium ferulate to rats at a dose of 236 mg/kg, the platelet aggregation induced by collagen was significantly suppressed, however, the platelet aggregation induced by TMVA or ADP showed no obvious change.

Key words *Trimeresurus mucrosquamatus* venom Platelet aggregation  
Rat Sodium ferulate Prostaglandin E<sub>1</sub>